

氏名	仲 谷 照 代
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	第3610号
学位授与年月日	平成11年 3 月24日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	Effect of zinc deficiency on hepatocytes (肝細胞における亜鉛欠乏の影響)
論文審査委員	主 査 教 授 湯 浅 勲    副主査 教 授 片 山 洋子 副主査 教 授 平 井 和子

### 論 文 内 容 の 要 旨

亜鉛は細胞の代謝、成長促進や細胞膜の安定化など様々な生理機能に関わっていると考えられ、亜鉛欠乏により成長遅延や味覚障害、皮膚炎などの機能障害を引き起こすことが知られている。亜鉛は多くの亜鉛酵素や転写因子などの構成成分としてDNA合成に重要な役割を果たしていることは知られているが、亜鉛欠乏とこれらの酵素などの変化とは必ずしも一致しておらず、亜鉛欠乏における生化学的メカニズムは解明されていない。本研究では、生体内における亜鉛の作用メカニズムを明らかにすることを目的とし、ラット肝細胞を用いて検討を行なった。

亜鉛と細胞増殖との関連性について、細胞増殖必須因子であるポリアミン（プトレッシン、スペルミジン、スペルミンなどの生体内アミンを総称して呼ぶ）の生合成律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素（ODC）に着目し、検討を行なった。ODC活性は、インスリンやEGFにより顕著に誘導され、培養12時間前後において最大活性となった。Diethylenetriamine pentaacetic acid(DTPA) 添加により $Zn^{2+}$ を欠乏させると、ODC活性や細胞内ポリアミン量及びDNA合成がそれぞれ、Controlの約50%に減少した。また、 $Zn^{2+}$ の要求時間は培養 6 ～ 8 時間の間である事を明らかにした。 $Zn^{2+}$ 欠乏によるODC活性の抑制は、ODC mRNA量に変化がなく、ODC活性の半減期が約 2 倍速くなる事から、酵素分解レベルにおいて行なわれる事を明らかにした。その詳細なメカニズムを検討した結果、DTPA添加により、ODCと結合する事により分解へと導くアンチザイム(AZ)とODCとの複合体(ODC-AZ)の全ODC量に対する割合が約 2 倍増加する事、またその増加はAZの働きを抑制するAI量の減少（約50%）による事を見出した。この事から、 $Zn^{2+}$ は“AZを介するODC分解機構”に関与することによってODC活性調節、その生成物であるポリアミンの調節に重要な働きを果たしている事を明らかにした。

細胞増殖と同様、生物固体の生命維持に重要な役割を持っている自発的細胞死、アポトーシスとの関連性について検討を行なった。方法としては、亜鉛欠乏群として、細胞膜浸透性のキレーターであるN,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine(TPEN:30 $\mu$ M) を添加し、亜鉛添加群としては培養 1 時間後に $ZnSO_4$ (20 $\mu$ M) を添加した。細胞膜浸透性キレーターであるTPEN添加による亜鉛欠乏により、アポトーシスを引き起こす事が、生化学的、形態学的観察により確認できた。その際、細胞内抗酸化剤である還元型グルタチオン(GSH) 量が減少するが、亜鉛添加により回復した。さらに、生体内GSH前駆物質であるN-acetyl-L-cysteine(NAC)添加によりアポトーシス誘導が抑制された。細胞膜非浸透性キレーターであるDTPAではアポトーシスは起こさなかった。これらの事から、TPEN添加による亜鉛欠乏によりGSHを含めた細

胞内酸化・還元状態に影響を与え、その結果アポトーシスが引き起こされることが示された。

以上のことから、細胞内亜鉛の欠乏状態によって生体に及ぼす影響が異なる事が示された。DTPA添加による穏やかな亜鉛欠乏では、ODC活性、ポリアミン量の減少を引き起こしDNAの合成障害を起こすが、TPENによるより厳しい亜鉛欠乏状態では、アポトーシスによる細胞死を引き起こす事が示された。本研究において得られた成果は、亜鉛欠乏により起こる様々な機能障害の解明に、手がかりを与えるものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

微量栄養素である亜鉛が欠乏すると、成長遅延、味覚障害や皮膚炎などの機能障害をおこすことが知られている。しかし、それらのメカニズムの詳細は明らかでない。本論文は、生体内における亜鉛の作用メカニズムを明らかにするために、ラット初代分離肝細胞の実験系を用い研究し、亜鉛欠乏によりおこる細胞増殖の阻害や細胞死にいたる詳細なメカニズムを明らかにしたものである。

本論文の第一部では細胞増殖と亜鉛の関係について検討している。著者は細胞増殖必須因子であるポリアミンに着目し、その生合成経路の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)の活性に及ぼす亜鉛の影響について検討した。分離培養肝細胞において、インスリンと上皮細胞成長因子(EGF)の添加によりおこる細胞増殖の際に、ODC活性はインスリンなどの添加後12時間で最大となる。このODC活性の増加が細胞増殖に必要であることをODCの特異的阻害剤を用いて確認した後、2価の金属キレーターであるdiethylenetriamine penta-acetic acid(DTPA)により亜鉛欠乏にするとODC活性が約50%に減少することを明らかにした。また、DTPAによる活性減少は亜鉛の再添加により回復するが、他の2価金属を再添加してもおこらないことから、DTPAの添加による影響は亜鉛に特異的な現象であることを確認している。DTPAの添加による亜鉛欠乏により、ODC活性の減少に続き、細胞内ポリアミン量が減少し、DNA合成も約50%に減少した。細胞増殖の指標であるDNA合成がODC活性と同程度に抑制されること、また亜鉛の再添加により回復することから、ODC活性の減少は亜鉛欠乏により起こる細胞増殖の阻害に密接に関連していることを明らかにした。著者はさらにODC活性の抑制メカニズムについて検討している。DTPA添加によりODC mRNA量には変化がなく、ODC活性の半減期が約2倍早くなることから、ODC活性の亜鉛欠乏による調節は酵素分解のレベルでおこっていることを明らかにしている。さらに、DTPA添加により、ODCと結合することによりODCを分解へと導くアンチザイム(AZ)とODCとの複合体(AZ-ODC)の全ODC量に対する割合が約2倍増加すること、またその増加はAZの働きを抑制するアンチザイムインヒビター(AI)量の減少(約50%)によることを見いだした。これらのことから、亜鉛はAZを介するODC分解機構に関与することによってODC活性を調節し、その結果細胞増殖を調節していることを明らかにした。

亜鉛の欠乏がよりひどくなると、細胞死をおこす。第2部では細胞死のメカニズムについて検討している。細胞膜浸透性の金属キレーターであるN,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine(TPEN)の添加により亜鉛欠乏をよりひどくすると自発的細胞死であるアポトーシスをおこすことを、生化学的および電子顕微鏡による形態学的観察により確認している。その際、細胞内抗酸化物質であるグルタチオン量が減少すること、またグルタチオンの前駆体であるN-acetylcysteinの同時添加によりアポトーシスの誘導が抑制されることを見いだしている。細胞膜非浸透性のDTPAではグルタチオンの減少およびアポトーシスの誘導はおこらなかった。これらの結果より、亜鉛欠乏がよりひどい場合は細胞内グルタチオンを下げることにより、細胞内酸化・還元状態に影響をあたえ、細胞死を起こすことを明らかにしている。

以上のように、本論文は亜鉛欠乏によりおこる細胞増殖の抑制や細胞死にいたる詳細なメカニズムを解

明したものであり、多くの新しい知見をもたらした。よって、本論文は博士（学術）の学位を授与するに値するものと認める。